

分类号 _____

密级 _____

UDC _____

编号 _____

厦 门 大 学 博 士 后 研 究 工 作 报 告

赤点石斑鱼、大黄鱼几种天然 免疫因子的基因克隆及特性研究

张之文

合 作 导 师 苏永全 教授

工作完成日期 2006 年 6 月 — 2008 年 6 月

报告提交日期 2008 年 12 月

厦 门 大 学 (福建 厦门)

2008 年 12 月

赤点石斑鱼、大黄鱼几种天然
免疫因子的基因克隆及特性研究

THE GENE CLONE AND CHARACTERATION OF
SEVERAL INNATE IMMUNE FACTORS FROM
Epinephelus akaara AND *Pseudosciaena crocea*

博 士 后 姓 名 张之文

流动站（一级学科）名称 海洋科学

专 业（二级学科）名称 海洋生物学

研究工作起始时间 2008 年 8 月

研究工作期满时间 2008 年 12 月

厦 门 大 学

2008 年 12 月

厦门大学博士后研究报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期：

内 容 摘 要

脊椎动物中免疫系统主要由天然免疫与适应性免疫两部分组成。鱼类作为最低等的脊椎动物，虽然在进化中获得了适应性免疫，由于鱼类的适应性免疫的产生受到多重因素的影响。在抵抗外界病原入侵的过程中，鱼类的天然免疫系统仍然具有至关重要的作用。本研究以赤点石斑鱼与大黄鱼为研究对象，对赤点石斑鱼的天然免疫因子凝集素、MHC IIB 与 ICLP，大黄鱼的识别因子肽聚糖识别蛋白 (peptidoglycan recognition protein, PGRP) 与巨噬细胞移动抑制因子 (Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF) 进行了初步研究。报告内容如下：

1. 凝集素 (lectin) 在脊椎动物与无脊椎动物中是天然免疫系统关键的组成部分，能够特异识别清除病原菌。本研究基于赤点石斑鱼的 EST 序列设计特异引物，通过 RACE 的方法得到该基因全长 cDNA 序列，将其命名为 EALec1。其中 cDNA 序列全长为 827bp，5-UTR 为 28bp，3-UTR 为 151bp，具有明显的加尾信号 AATAAA。开放阅读框 648bp，编码 215 个氨基酸，其中信号肽长度为 31 个氨基酸。氨基酸分析表明，该序列在 N 端有丰富的半胱氨酸残基、胶原区特点的 G-X-Y 重复序列、颈区及 C-末端具有糖识别位点，属于 C 型胶原凝集素；其 CRD 区域的糖识别关键氨基酸为 EPD，可能是甘露糖型凝集素向半乳糖型凝集素分化的一个过度类型。

2. RT-PCR 以及 real-time PCR 检测结果表明在赤点石斑鱼的 12 个不同组织中均有不同程度的表达。RT-PCR SSCP 结果表明在赤点石斑鱼的 12 个组织中，获得 4 种表达类型的 Lectin，利用 PCR 获得了 lectin DNA 序列，与 cDNA 相比较，EALec 具有 4 个内含子，5 个外显子。将 EALec-1 克隆到 pET28(A) 转化 BL21 表达菌中，获得 26Kd 大小的蛋白表达片段，体外试验表明，该蛋白对革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌均具有凝集作用，糖特异性结合试验表明，该蛋白为甘露糖型凝集素。

3. 本研究克隆获得赤点石斑鱼非特异性免疫因子 MHC IIB 基因的 4 个 cDNA 全序列，序列全长为 1195-1355bp，含有 3' UTR、启动子、多肽结合区 (β 1)、IGC 区 (β 2)、跨膜区、胞质区和 5' UTR 区，编码区大小为 750bp。RT-PCR 与 SSCP 技术研究了赤点石斑鱼 MHC IIB 的表达多态性，发现其在头肾、心、

肝等 12 个组织器官中均能有效表达，表达多态性也异常丰富。

4. MHC class II 恒定链 (invariant chain-like proteins ICLP) 与免疫反应密切相关，其参与对抗原的处理，保证多肽不被进一步降解为氨基酸。通过 RACE 反应获得赤点石斑鱼 ICLP2 cDNA 全序列，全长 1837 bp, 包括 44bp 的 5' UTR 区，861 bp 的开放阅读框以及 932 bp 的 3' UTR 区，编码 286 个氨基酸。对赤点石斑鱼 10 个组织的 ICLP2 基因进行 PCR 扩增和测序，结果表明赤点石斑鱼 ICLP2 基因的表达不存在组织特异性。此外，氨基酸序列同源比对的结果表明，赤点石斑鱼与其它 16 种脊椎动物 ICLP2 的相似度在 25~78% 之间，与狼鲈和鳊鱼 ICLP2 因子的同源程度最高，分别为 78% 和 74%。

5. 肽聚糖识别蛋白 II (pglyrp2) 是一类具酰胺酶的模式识别受体，通过 RACE 技术克隆了大黄鱼的 pglyrp2 基因，cDNA 全长 1831bp, 带有一个 1449bp 的开放阅读框，编码带有一个 21 个氨基酸信号肽的 482 个氨基酸的 pglyrp2 蛋白。RT-PCR 和荧光定量 PCR 分析表明，大黄鱼 pglyrp2 基因在肝脏强烈表达，在性腺、肠、胃中弱表达；大黄鱼的 pglyrp2 还在未受精卵中高度表达，在胚胎发育和卵黄囊仔鱼阶段低量表达。通过人工感染模型发现，大黄鱼的 pglyrp2 还是一种组成型兼诱导型的急性时相蛋白，它的诱导伴随着宿主抗氧化免疫防御反应的激活。通过原核表达载体 PET28a 表达并纯化了大黄鱼 pglyrp2 的重组蛋白。

6. 本文采用同源克隆的方法从大黄鱼肝脏中克隆了大黄鱼 MIF 的同源基因。大黄鱼 MIF 的 cDNA 全长 634bp, 编码一个长 115aa 的蛋白质，其基因结构非常保守，具有 3 个外显子和 2 个内含子。RT-PCR 与荧光定量 PCR 研究表明：大黄鱼 MIF 基因在所选的 11 个组织中都有表达，其中在脑和肝中表达量较高。将哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 人工攻毒后的大黄鱼作为研究炎症反应的材料，发现大黄鱼 MIF 在攻毒后大黄鱼的肝脏、性腺和头肾中的 mRNA 表达量显著升高。首次表明鱼类 MIF 可能参与了炎症反应的发生发展。利用原核表达载体 PET28a，体外表达和纯化了大黄鱼 MIF 融合蛋白。生物活性分析首次表明鱼类 MIF 融合蛋白具有硫醇蛋白氧化还原酶的活性和激活巨噬细胞释放 NO 的功能。

关键词:天然免疫；赤点石斑鱼；大黄鱼；凝集素；MHCIIb；MHCII 恒定链；肽聚糖识别蛋白；巨噬细胞移动抑制因子

Abstract

The immunology system of vertebrate is comprised of innate and adaptive defense mechanisms. As a kind of primitive vertebrates, fish obtained the adaptive immunity in ancient evolutionary history. Meanwhile, this specific immune defense in fish has more constraints than endothermic vertebrates when focus on their temperature-dependent, limited antibody repertoires, affinity maturation and relatively slow response. Thus, innate immunity is considered so far to be a more essential defense system against infection in fish. So the report based on the factors about innate immune system, and the contents were as follows: MHC IIB and MHC II Invariant chain-like proteins (ICLP) of *Epinephelus akaara*; Peptidoglycan recognition protein II (pglyrp2), and Macrophage migration inhibitory factor (MIF) from the large yellow croaker.

1. Based on the sequence of EST library, the complete cDNA of a C-type lectin was obtained from *Epinephelus akaara* with RACE techniques and was named as EALec1. The complete cDNA sequence of EALec1 is 827bp, of which 5-UTR is 28bp, and 3-UTR is 151bp. It also possesses a polyadenylation signal AATAAA and a poly(A) tail. The EALec1 cDNA encodes a polypeptides with 215 amino acids, which includes a signal peptide of 31 amino acids. The protein has a cysteine-rich region in N terminal, a collagenous region characterized by G-X-Y repeats, a neck region and a typical carbohydrate-recognition domain (CRD), indicating that EALec1 is a collectin. The key recognition positions of this CRD are EPD, which is for the first time isolated from the fish, and may likely be the interim type between mannan-binding lectin and galatose-binding lectin. The expression pattern of EALec1 was studied in 12 different tissues using RT-PCR. The results indicate that EALec1 expresses in all these tissues with different level.

2. In this study, the genomic gene of a novel collectin (Designed EALec1) from red-spotted grouper *Epinephelus akaara* had been sequenced, the genomic structure of EALec1 and alignment of Carbohydrate recognition domain (CRD) sequence among three collectins implied that like GalBL, is a new type collectin derived from MBL in certain stage. The expression pattern of EALec1 transcripts in twelve tissues of red-spotted grouper was studied by quantitative RT-PCR and single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. The result not only shows that EALec1 transcripts could be detected in all twelve tissues, In order to investigate its immune functions and carbohydrate binding characterization, EALec1 was recombined with pET28(A) and expressed in *E. coli* BL21(DE3)-pLysS. The recombinant EALec1 can agglutinated both Gram-negative pathogenic *V. harveyi* and Gram-positive non-pathogenic *S. aureus* and *B. subtilis* in vitro and the agglutinated activity was evidently Ca^{2+} dependent. Meanwhile, its bacteria agglutination activity can be inhibited by mannan. These result indicated that EALec1 was belong to mannan-binding lectin despite of its different Ca^{2+} -dependent sites in CRD and was involved in the recognize and clearance of invaders in red-spotted grouper.

3. Four complete cDNA sequences of MHC class II β chain, the important non-specific immune genes, were obtained from the grouper. The whole sequences has 1195-1355bp, which consist of:

a 3'UTR, promoters, a peptide-binding region(β 1), an immunoglobulin-like region(β 2), a transmembrane region, a cytoplasmic region and 5'UTR, and the size of its coding region is 750 bp. The tested gene has classic MHC 3D molecular structure, and exhibit abundant polymorphisms in the peptide-binding region. Using RT-PCR and SSCP technique, high levels of expression and polymorphism were observed in all the 12 tissue studied such as head-kidney, heart and liver.

4. Using RACE methods, the full-length cDNA of ICLP2 gene from *E. akaara* was obtained. The full-length cDNA is 1837bp which consists of 44 bp 5'UTR, 932 bp 3'UTR (including poly(A)) and 861 bp open reading frame, and the predicted protein has 286 amino acids with a molecular weight of 31878Da. The result also shows that there is no tissue-specific transcript expression of ICLP2 gene in *E. akaara*. Moreover, the similarity of the ICLP2 sequence is ranged from 25% to 78% when compared *E. akaara* with that of other 16 vertebrate animals, and the result shows that *E. akaara* has the closest relationship with *Dicentrarchus labrax* and *Siniperca chuatsi*.

5. The gene encoding pglyrp2 of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) was cloned by RACE approach; the full-length cDNA (1831bp) of pglyrp2 of *P. crocea* contains a 1446bp open reading frame that encodes a putative protein of 482 amino acids with one 21-residue signal peptide. In addition, tissue distribution analysis via RT-PCR and Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR) assays indicated that pglyrp2 could be strongly expressed in liver and weakly in gonad, intestine and stomach. Also, maternally derived pglyrp2 displayed a high mRNA level in unfertilized eggs, following low expression throughout embryogenesis and yolk-sac larvae. Moreover, the pglyrp2 of *P. crocea* was confirmed to be both constitutive and inducible in liver through an artificial infection model. Therefore, pglyrp2 of *P. crocea* was believed to play important role in defending against invading bacteria possibly through bacteria recognition and initiating activation of host immune defense. A synthetic form of pglyrp2 of *P. crocea* obtained in this paper by recombinant expression of pglyrp2 in *Escherichia coli* is helpful for further physiological and functional research of such a new class of fish antibacterial protein in future.

6. The full-length cDNA of Macrophage migration inhibitory factor (MIF) was isolated from *P. crocea* using RACE. It was 634 bases long and contained an ORF of 348 bases encoding a protein of 115 amino acid residues. The coding region of genomic DNA of PcMIF was organized into 3 exons and 2 intervening introns, which is conserved through evolution. As revealed through RT-PCR and real-time PCR analyses, MIF mRNA was constitutively expressed in 11 selected tissues and relatively abundant in brain and liver; In addition, up-inducible MIF mRNA levels detected in liver, gonad and head kidney were coupled with inflammatory caused by artificial infection by *V.harveyi*, the present study represents the first investigation of fish MIF in pathogenesis of fish inflammatory disease. Moreover, PcMIF fusion protein was in-vitro expressed and purified using prokaryotic expression vector pET28a. Bioactivity assay demonstrated that recombinant PcMIF had TPOR activity and macrophage-activating property by increasing NO production.

Key word : innate immune, *Epinephelus akaara*; *Pseudosciaena crocea*; lectin; MHCIIB; ICLP; PGRP; MIF

目 录

1	绪论.....	1
1.1	干扰素与 Mx 蛋白.....	2
1.2	抗病毒细胞毒性细胞	3
1.3	溶菌酶	4
1.4	补体系统	4
1.4.1	溶血血清活性	5
1.4.2	调理素	6
1.4.3	凝集素	6
1.4.4	C-反应蛋白	11
1.5	天然抗体	11
1.6	细胞因子	12
1.7	抗菌肽	13
1.8	主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC) .	13
1.9	微生物生长抑制因子	14
1.10	MIF 因子	15
1.11	肽聚糖识别蛋白 (Peptidoglycan recognition protein PRGP)	16
	参考文献:	17
2	工作内容.....	21
2.1	DNA cloning and characterization of a collectin from red-spotted grouper (Epinephelus akaara)	21
2.1.1	INTRODUCTION.....	21
2.1.2	MATERIALS AND METHODS	22
2.1.3	Results	25
2.1.4	Discussions	28
	References:.....	31
2.2	Characterization and bacterial-binding activity of a novel C-type lectin from red-spotted grouper Epinephelus akaara.....	33
2.2.1	Introduction	33
2.2.2	Materials and methods	35
2.2.3	Result.....	39
2.2.4	Discussion.....	44
	References:.....	46
2.3	赤点石斑鱼 ICLP 基因的克隆和序列分析	48

2.3.1 材料与方法	49
2.3.2 结果与分析	51
2.3.3 讨论	56
参考文献:	57
2.4 赤点石斑鱼 MHC IIB 基因的克隆与表达多态性分析.....	60
2.4.1 材料与方法	61
2.4.2 结果	64
2.4.3 讨论	68
参考文献	72
2.5 MIF 基因的分子克隆, 表达分析和功能鉴定	74
2.5.1 材料与方法	75
2.5.2 结果:	79
2.5.3 讨论:	86
2.5.4 结论	87
参考文献:	88
2.6 大黄鱼肽聚糖识别蛋白 2 的基因克隆、mRNA 表达与重组表达的研究	
91	
2.6.1 材料与方法	92
2.6.2 结果	96
2.6.3 讨论	106
参考文献	109
致谢	112
博士生期间发表的学术论文、专著	113
博士后期间发表的学术论文、专著	114
个人简历	115

1 绪论

目前全世界直接消费鱼大约有 40%是养殖的^[1]。虽然至今大部分的水产养殖仍是淡水物种，但海水养殖的产量已急剧增加。赤点石斑鱼肉质鲜美、营养丰富，是我国南方名贵的海水经济鱼类。80 年代以来，我国东南沿岸海域相继发展石斑鱼的网箱养殖。随着养殖规模的不断扩大，海区天然种苗供不应求，石斑鱼养殖受到了限制，开始投入大量人力物力，开展赤点石斑鱼的人工繁殖和育苗研究工作，并获得一定成效。曾陆续有人工育苗成功的报道，但目前人工孵化鱼苗易于感染病毒，其成活率仍很低，养殖用的种苗仍大部分依靠自然捕捞。这些都制约着养殖业的发展^[2]。大黄鱼是中国特有的优质海水鱼种，其分布范围局限于黄海南部至南海北海海域，以往由于过度捕捞导致野生资源匮乏，自 1986 年人工培育成功后，开始人工繁育的工作，目前大黄鱼的养殖范围迅速扩大，仅福建省年育苗量即可达到 12 亿尾，直接产值超过 20 亿元。但是随着养殖的发展，由于养殖密度偏大，水体超负载，养殖环境污染严重，病害问题相继出现，大黄鱼发病率上升，已成为制约大黄鱼养殖业持续稳定发展的主要因素^[3, 4, 5, 6]。目前对水产养殖业存在的病害问题，药物防治是主要的解决途径，但存在污染环境和易于产生抗药性的不良后果。因此，通过提高鱼类自身的免疫力来防病抗病，应该是今后水产养殖业健康发展的一条主要的途径。

硬骨鱼的天然免疫与适应性免疫系统在鱼类的生长过程中具有非常重要的防御作用。与陆地上的动物不同，鱼生活在水中，水体中存在着大量的微生物与病毒，这些微生物与鱼的接触十分亲密，其中有许多微生物是腐生的，还有一些是病原菌，这些种类的细菌寄生在鱼体上，能够消化与降解鱼的组织。然而在正常条件下，鱼类借助于自身所特有的天然免疫机制对这些病原菌进行防御，从而保持着健康的状态。鱼类免疫机制包括组成性的免疫系统与适应性的免疫系统这两个方面，从而阻止病原体对鱼体的吸附、侵入以及在鱼体内的增殖。这些免疫机制主要有三方面的特点，（1）具有非特异性，即可以不借助于任何识别机制来进行识别外源的病原；（2）具有快速性，当病原体对鱼体进行作用时，这些防御机制很快就会发生作用，甚至在诱导性的防御中，如在炎

症反应不超过 1-2 天, 就能快速反应, 消除病原菌的侵袭; (3) 对温度变化不敏感, 在变温的脊椎动物中这些特点具有非常重要的作用, 在变温动物中要产生特异性免疫反应需要一定的时间来完成, 并且产生特异性的免疫需要很非常明显的温度依赖性。例如在鲑鱼中, 抗体的产生在适宜的温度下, 至少需要 4-6 个星期才能完成, 而许多病原菌只需要几天的时间就完全可以把鱼体杀死。由此可以看出特异性免疫只有在免疫过的鱼体中才能发挥重要作用。因此, 天然免疫系统中的凝集素、溶菌酶及补体等, 在鱼类中的防御作用要比特异性的免疫因子更为重要^[7,8,9]。

天然免疫系统的主要作用, 在鱼类中被认为是防卫病原体入侵的第一道防线, 并且在适应性免疫发挥作用之前, 就能够有效消灭病原菌^[10, 11]。实际上在低等脊椎动物中, 由于缺乏典型的适应性免疫, 因此其天然免疫因子在功能进化上是相对保守的。现在将天然免疫因子分述如下:

1.1 干扰素与 Mx 蛋白

在脊椎动物中 I 型的干扰素是快速强有力的抗病毒的系统, 干扰素 (Interferons IFNs) 是一种具有 pH 抗性的细胞因子, 在受到病毒的感染时, 许多种类的细胞都可以产生^[12]。双链的 RNA (dsRNA) 病毒能够诱导 IFN 的产生, 多聚肌酐酸 (poly I:C) 是一种诱导 IFN 产生的重要化合物^[13]。许多种类的病毒在复制的过程中产生 dsRNA, 借助于 IFN 动物机体识别这些 dsRNA, 在哺乳动物中, IFN 刺激机体表达一系列的蛋白如 2', 5' 寡腺苷酸合成酶, 蛋白激酶 P1 及 Mx 蛋白, 这些蛋白能够抑制病毒 mRNA 的翻译。自 1965 年首次发现鱼类干扰素活性物质以来, 陆续在鲱鱼 (*Pimephales promelas*)、虹鳟 (*Salmo gairdneri*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、欧洲狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 等鱼体和培养细胞系检测到干扰素和由干扰素诱导的 Mx 蛋白。证实病毒感染之后, 这些基因的表达具有非常明显的增加^[14, 15, 16]。

体内与体外实验证实类 IFN 与 Mx 蛋白对 VHS、IHN、IPNV、ISA 及 Poly I:C 具有明显的免疫反应。同时在细胞系中这些蛋白的功能也得到类似的证实。

在虹鳟中 Mx 基因具有三种类型基因与蛋白，而在大西洋鲑以及大西洋鳕中只有两种 Mx 基因型，在虹鳟中该蛋白的分子量大约为 70Kd，鲑鱼中的分子量为 76Kd。

干扰素在鱼类感染病毒后很快会在体内转录翻译，在虹鳟中在注射 2 天后，就可以观察到干扰素的表达与翻译，即便在幼体的鱼中也可以发现该蛋白的产生。当用 Poly I:C 注射大西洋鲑时发现在巨噬细胞中 IFN 24 小时后达到最高，而 Mx 蛋白则在 48 小时后达到最高。而在 Mx 则在其他的组织中需要 2-14 天之后才能够产生。由此可见 IFN 在病毒感染的初期就可以发挥作用，因此被人为是在特异性免疫产生之前机体主要的天然免疫反应，然而在血清中显示，IFN 的产生与病毒的抗性关系不大，而在对病毒最敏感的鱼体中 IFN 的表达量是最高的^[17,18]。

1.2 抗病毒细胞毒性细胞

在高等动物中存在一种毒性细胞叫自然杀伤细胞（natural killer，NK），可以将早期感染病毒的体细胞裂解，借此来抑制病毒在体内的复制与扩散。这方面的工作在鱼类中的研究已经展开，研究发现鱼类中存在类 NK 细胞，这种细胞可以自动杀死异源、异种及病毒感染的细胞^[19]。在鲑鱼中存在着异源激活的类 NK 细胞，并且从外周淋巴细胞中分离并建立了几种类 NK 细胞系，在这些细胞系中有一些是具有非特异性的，而另外一些则表现出同种特异性并且可以表达 T 细胞受体（T cell receptor，TCR）。在鲤鱼、虹鳟和鲑鱼中克隆到 NK 细胞增强因子（NKEF）基因^[20,21,22]，这类基因在哺乳动物中具有加强 NK 细胞的杀伤作用。在虹鳟中克隆得到这类基因表明在虹鳟中具有类 NK 细胞的存在。第二类在鲑鱼中得到的 NK 细胞为器官组织的非特异性细胞毒细胞，这类细胞能够表达非特异性细胞毒细胞受体蛋白，这类受体蛋白在其他种类的毒细胞中是不表达的。第三类细胞毒细胞，即清除病毒感染细胞的毒细胞，现在的在硬骨鱼中的研究不多，主要集中在虹鳟与鲑鱼中。

在虹鳟中发现具有同种异源的细胞毒细胞^[23,24]，由于在不同的鱼类中已经发现存在着与哺乳动物类似的相容性组织复合体（MHC I），MHC I 的多肽结合位点能够识别不同种的病毒，当 MHC I 将识别的信号进行提呈，提呈到

CD8，引起细胞毒细胞的作用，将感染病毒的细胞进行杀死。

1.3 溶菌酶

溶菌酶是一种水解酶，能够识别并且降解 N-乙酰-D-氨基葡萄糖与 N-乙酰胞壁酸之间形成 1, 4 β 链组成的异源多聚原核细胞壁，导致细菌死亡。溶菌酶自上个世纪 60 年代开始研究，研究发现，根据分子量、氨基酸组成以及酶动力学特点，在脊椎动物中溶菌酶可以分为两种类型，即 C-型与 G-型^[25]。溶菌酶在鱼类的粘膜、血清以及卵中均有发现，腹腔巨噬细胞与血液中性粒细胞中均有溶菌酶，血液中性粒细胞则被认为是血清中溶菌酶产生的主要来源，其中 C-型溶菌酶从牙鲆、大菱鲆、虹鳟、斑马鱼与鲤鱼中分离出来^[26, 27, 28, 29, 30]，G-型溶菌酶在牙鲆、斜带石斑鱼与大黄鱼中分离出来^[31, 32, 33]，Paulsen 等^[34]研究发现细菌的脂多糖和酵母的葡聚糖明显的对大西洋鲑溶菌酶具有明显的加强作用。Brian 等^[35]（2005）在研究发现爱德华菌感染鲑鱼时，鲑鱼体内的溶菌酶表达产量明显提高。这些数据表明，溶菌酶消除细菌感染具有非常的作用。

1.4 补体系统

补体系统是脊椎动物抵抗微生物感染的重要成分，由存在于体液中的数十种具有酶活性的球蛋白组成。补体系统也是鱼类抵抗微生物感染的重要机制之一。硬骨鱼中补体系统与高等的脊椎动物类似，需要借助于3个途径进行激活，(1)经典的途径即Toll-like receptor途径，通过识别病原的分子模式蛋白进行识别病原，抗体结合到细胞的表面，引起细胞的补体反应，同时C-蛋白等初期蛋白与病原菌、病毒以及病毒感染的细胞结合刺激也能引起的补体反应；(2)NOD（核苷酸结合寡聚化结构域）参与胞内微生物的模式识别，NOD是一类位于胞质有典型的LRR-NBS结构的蛋白质家族，可以识别细菌细胞壁成分--细菌肽聚糖(peptidoglycan, PGN)，活化NF- κ B，参与固有免疫应答并诱导炎症反应和细胞凋亡；(3)依赖于凝集素引起的补体反应类型，主要是甘露糖凝集素结合细菌表面的甘露糖，然后形成蛋白复合体，进而产生补体反应。与高等脊椎动物相比，鱼类的补体对热更不稳定，具有更低的最适反应温度，更难以保存，抗微生物活性更高，而且具有更明显的种或种群特异性^[36]。

C3是三个活化途径的中枢补体成分，可以与许多蛋白质相互作用，通过免疫细胞的调理作用、补充和炎症反应促进作用，C3蛋白水解活化作用导致吞噬细胞吞噬作用增强^[37]。

目前研究表明在所有的硬骨鱼中均存在着C3，C4与B细胞因子，在硬骨鱼中C3存在着多种类型，这些不同类型的C3可以与存在鱼细胞表面的补体激活系统进行识别，这些不同的结合形式，使得鱼类可以识别、中和多种潜在的病原，C3的类型越多，越是表明鱼类在天然免疫系统中能够识别更多的病原，就对病原表现出更强的识别能力^[38]，硬骨鱼C3由一个二硫键，两条链（a和b）糖蛋白组成，硬骨鱼C3与一些非硬骨鱼脊椎动物的C3类似，目前在鳟^[39]、金头鲷^[40]、鲤鱼^[41]以及青鳉^[42]中分离得到C3，同时表明，在这些硬骨鱼中，C3在类型上存在着多态性，其中站在鳟鱼中C3具有5种类型，在鲤鱼中也存在着5种类型的C3，它们之间的同源性在80%以上，青鳉种分离出2种类型的C3，同源性高达90%。这些多态性的产生主要是由于在硬骨鱼中存在着染色体加倍现象，在染色体进行复制的过程中，在自然选择的压力下，导致C3出现多个拷贝。在大西洋鳕中研究表明C3的早期表达在免疫防御方面具有相当重要的意义^[43]。补体主要包括溶血血清活性、调理素、凝集素与C-反应蛋白。

1.4.1 溶血血清活性

血清的溶血活性为补体系统的旁路系统，具有识别病原的作用。在鱼类中溶血血清与高等动物中具有不同的功能，在硬骨鱼中，溶血血清在特异性的作用靶位分子上与哺乳动物相比具有更明显特异性。硬骨鱼血清溶血活性与哺乳动物的血清相比，具有更强的溶血活性，但表现出更不耐热，这与鱼的生活环境温度比哺乳动物低有关。在大西洋鳕血清的研究中发现，血清具有抑制酵母聚糖和细菌的磷脂多糖的活性，这表明它类似于天然补体^[44]。

在硬骨鱼中载脂蛋白A-1（Apolipoprotein A-1, APOA-1）和APOA-II为最重要的血浆蛋白。一般说来，载脂蛋白具有脂代谢功能，但是最近越来越多的研究表明，在硬骨鱼载脂蛋白，尤其是载脂蛋白APOI-A，在条纹石鲈（*striped bass*）的血清中分离得到的APOA-I（Johnston, 2008）^[45]体外实验结果表明，APOA-I对*Streptococcus sp.*, *Escherichia coli* 与*Mycobacterium marinum*

等病原菌表现出抗菌活性，Franz Villarroel（2006年）^[46]在虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）中研究发现，APOA-I对革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌均表现出抗性作用。鱼类中的载脂蛋白也具有哺乳动物中的脱脂蛋白的功能，在天然免疫过长中对病毒、病原菌和炎症反应均表现出防御功能。因此认为推测高密度脂蛋白和它的脱脂蛋白是鱼分类上先天防御机制的重要效应物。

1.4.2 调理素

在硬骨鱼中补体调理素已经证明存在于鲤鱼、斑点叉尾鲶、鲑鱼等鱼类中^[47]。在鲑鱼中抗体在补体存在情况下能够中和包膜病毒如IHNV和VHS。通过补体组成成分形成的调理作用，可以激活单核细胞与多颗粒巨噬细胞，引起吞噬细胞与中性粒细胞对外源病原进行吞噬。

1.4.3 凝集素

凝集素(lectin) 是一类能选择性地识别糖并与之非共价可逆结合的非酶、非抗体蛋白质^[48]。广泛分布在微生物、植物以及动物中，以膜结合蛋白或可溶性状态的形式出现。目前根据序列的相似性可以分为 7 个家族，分别是半乳糖凝集素(galectin)、C-凝集素、P-型凝集素、I—型凝集素，L-鼠李糖结合型凝集素、肝素型凝集素与正五聚蛋白型凝集素^[49]。

凝集素现象最早于 1860 年在蛇毒中发现，C-型凝集素最早是于 1906 年在牛中发现胶固素，1988 年 Drickamer 认为糖结合活性决定于有限的肽片断,他自己命名为糖识别域-CRD，并且建议根据 CRD 区域将凝集素进行分类，将 Galectin 中的糖识别域命名为 S-CRD，将 C 型凝集素中的糖识别域命名为 C-CRD^[50]。一般说来，C-凝集素又称 Ca^{2+} 依赖型凝集素，只有当 Ca^{2+} 存在的时候才具有活性^[51]。到现在已经分离出 1000 多种凝集素，其中绝大部分不具有凝集效应^[52]。

1.4.3.1 C-型凝集素

C-型凝集素是指在 CRD 区域，具有 1 个或 2 个 Ca^{2+} 结合位点的这一类凝集素^[53]。不同类型的 C-型凝集素识别不同的糖。1993 年 Drickamer 根据

CTLD 区域的结构的不同将 C-型凝集素分为 7 类^[54], 2003 年又将凝集素分类进行修改, 凝集素的分类达到 14 类^[55]。Alex N.等 (2006 年)^[52]将 C-型凝集素分为 17 种类型。分别是 Lecticans、Asialoglycoprotein and DC receptor、胶原凝集素、选凝素、自然杀伤细胞受体、多糖识别区域的枝状细胞受体、reg group、软骨凝集素、四结合素、多囊蛋白 1、attractin、磷雌氮芥结合蛋白 (EMBP)、整合膜蛋白 2 (DGCR2)、血栓调节蛋白、Bimlec、SEEC 与 CBCP/Frem1/QBRICK。其中与免疫相关的主要是胶原凝集素与 group VII。

1.4.3.2 胶原凝集素

胶原凝集素最先是在人类血清中分离出来^[56], 主要甘露糖类凝集素, 随后在鱼类中发现。随着研究的深入, 发现这类凝集素是激活补体途径的重要组成部分, 一般说来, 在高等动物中这类凝集素是由肝脏分泌合成的, 在免疫过程中为识别病原的第一道防线, 在人类中, 当 MBL 出现缺陷时, 幼儿对病原具有易感性^[57], 在正常条件下 MBL 是由多个单体组合而成的, 一般是由 3 个单体甚至是 6 个单体, 胶原凝集素的单体在结构上具有 4 个结构域: N-端具有丰富的胱氨酸残基, 胶原样区 (Collagen-like region, CLR)、颈区和 C 端糖识别域 (carbohydrate- recognition domain, CRD)^[58]。

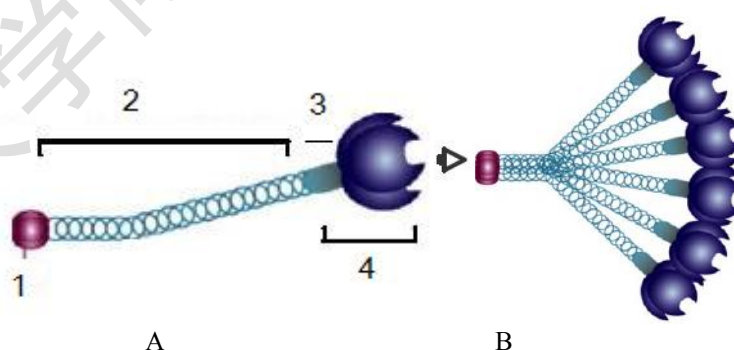


图 1 胶原凝集素的结构示意图

A 为单体结构, 1 为半胱氨酸丰富区, 2 为胶原区, 3 为颈区, 4 为糖识别区, B 为多聚体组成形式

其中半胱氨酸丰富区中的半胱氨酸在单体之间形成二硫键, 单体之间交联, 组成类似于郁金香结构的花柄, 胶原区为 G-X-Y (G 为甘氨酸, X,Y 为任意氨基酸) 组成重复序列区, 此处形成铰链区, 在功能上为效应功能区, 可以激活补体结合与结合胶原凝集素受体的功能区, 颈区功能不详, 糖识别区域为功能识别区, 能选择性识别多种病原体的糖结构。一般情况下单体的多肽没有糖识别活性, 只有在形成高聚体的形式才具有功能, 完整的胶原凝集素一般为

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库